Comparaison des méthodes d'isolement de la Microflore fongique du sol. Étude d'un terreau des serres du Muséum.

par Mme J. Nicot et Jean Chevaugeon.

Introduction. — Au cours d'un voyage d'étude en Angleterre, l'un de nous eut l'occasion de se documenter auprès de spécialistes anglais sur les techniques modernes d'isolement et d'étude des Champignons du sol, et en particulier de séjourner pendant plusieurs semaines à l'Université de Nottingham, auprès du Prof. C. G. C. Chesters. Celui-ci, dans des travaux poursuivis depuis 1939, met au point des méthodes tout à fait originales et particulièrement efficaces, susceptibles de renouveler complètement l'étude de la flore cryptogamique du sol et d'éclairer d'un jour nouveau les problèmes d'intérêt pratique qui se posent dans les domaines connexes, et plus particulièrement en Phytopathologie.

Dès 1923, Winogradsky (6) s'élevait contre les techniques pastoriennes couramment employées pour l'étude de la microflore bactérienne du sol et préconisait la « méthode directe » qui donne une image plus fidèle de la population d'un sol donné, dans des conditions précises de milieu. « Il n'est que trop évident, écrivait-il, que les conditions de culture pure sur milieu artificiel ne sont guère comparables à celles de l'existence sauvage d'une espèce quelconque ». Pour compléter les données de la microbiologie classique et de la biochimie se rapportant aux microbes isolés du sol et étudiés en dehors de ce milieu, la microbiologie agricole exigeait des méthodes spéciales permettant de suivre l'activité des bactéries dans les conditions complexes de leur vie normale, et de préciser les collaborations, les antagonismes ou les luttes entre les diverses catégories de microorganismes. Les critiques justifiées de Winogradsky, déjà ébauchées depuis plusieurs années par quelques auteurs, eurent rapidement une très large audience, et les trois groupes de méthodes qu'il préconisait alors (7) : microscopie microbiologique de la terre, culture naturelle dans la terre, culture auxiliaire dans un milieu solide imitant le sol, ont reçu de nombreux auteurs : Conn, Jensen, Cholodny, Waksman, Reinking, etc., des applications variées qui ont contribué aux progrès rapides réalisés dans le domaine de la Pédologie.

Ces procédés d'étude directe s'appliquent plus spécialement aux

bactéries du sol. Pour la microflore fongique, le problème semble plus complexe. En effet, les champignons se rencontrent dans le sol sous différents états qui, du point de vue morphologique, se ramènent à deux groupes : mycélium et spores. Le mycélium peut être, soit un mycélium actif en voie de croissance végétative, soit des fragments mycéliens introduits par les débris organiques, soit encore des sclérotes ou autres formes de mycélium « dormant ». Les spores sont, ou des organes de reproduction normaux et actifs, ou des formes de résistance à parois épaissies et momentanément passives ; elles peuvent provenir de champignons croissant actuellement dans le sol, mais aussi d'organismes transitoires dont le mycélium est maintenant détruit ; elles peuvent également être introduites avec les débris organiques du sol, ou être d'origine aérienne, transportées par l'air ou l'eau circulant dans le sol. Il est bien évident que pour ces organismes l'examen microscopique du sol prélevé in situ est absolument inefficace : les fragments de mycélium et les spores observées ne sont pratiquement pas identifiables ; ce procédé est susceptible tout au plus de fournir des renseignements d'ordre quantitatif sur la flore mycologique du sol.

Quant aux méthodes les plus fréquemment employées pour isoler les champignons du sol, elles relèvent de deux catégories :

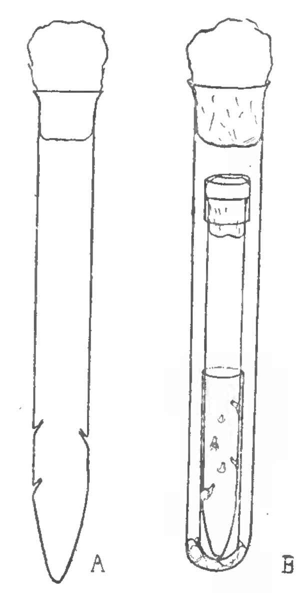
1. Isolement direct de particules du sol dispersées à la surface d'un milieu nutritif stérile.

2. Isolement indirect à partir d'une suspension dans l'eau stérile (pure ou glucosée) préparée en dilutions connues à partir du sol examiné.

Ces techniques, et plus spécialement celles du 2e groupe, appellent de sérieuses critiques. En effet, elles permettent indifféremment la croissance de tous les organismes vivant activement ou végétant dans le sol ; placés dans des conditions de milieu artificiellement favorables, les organes passifs se développent au même titre que les éléments réellement actifs du sol ; bien plus, une croissance végétative luxuriante peut avoir inhibé la faculté de sporulation d'une espèce qui peut ainsi se trouver surclassée par une espèce primitivement au repos ; en outre cette méthode donne l'avantage aux organismes à croissance rapide ou à sporulation particulièrement riche ; c'est le cas par exemple des Bactéries ou des Penicillium qui pullulent dans la plupart des isolements.

Le but que se propose le Professeur Chesters (1) est d'isoler les champignons du sol in situ, sur un milieu gélosé stérile introduit directement dans le sol par le moyen d'un tube percé d'orifices capillaires, en évitant toute contamination aérienne préalable. Un tel procédé a l'avantage de réaliser l'infection de la gélose sous les conditions actuelles de température et d'humidité du sol ; par

l'usage d'une large série de milieux, il permet d'isoler des champignons qu'on n'obtient pas habituellement à partir des ensemencements de sol ou de dilutions ; enfin, et c'est là à notre avis son intérêt essentiel, la facture des tubes contenant la gélose nutritive est telle que seul le mycélium se développant actuellement dans le sol peut entrer en contact avec le milieu. On obtient donc une image aussi fidèle que possible de la population crytogamique active dans les conditions naturelles soumises à l'expérience. L'intérêt de cette méthode analytique, qui permet de séparer les champignons croissant activement dans le sol des spores et débris de mycélium normalement passifs, n'est pas douteux. Aux phytopathologistes en particulier elle apporte un appoint précieux en permettant de réduire le champ des recherches et de serrer de plus près les problèmes relatifs à la dispersion et à la transmission par le sol des maladies cryptogamiques des plantes.



Immersion tube (d'après Chesters).
A : Coupe ; B : le tube en place.

L'étude de la rhizosphère d'une Cypripédiée des serres du Muséum nous a fourni l'occasion d'appliquer les différents procédés d'isolement des champignons du sol et de comparer les résultats obtenus en suivant la technique de Chesters avec ceux que fournissent les méthodes habituelles. Nous relaterons ici ces expériences et les observations qui en résultent.

Technique. — 1. A défaut de la totalité du matériel nécessaire pour l'application de l' « immersion tube method » telle que l'a décrite Chesters, nous avons opéré de la façon suivante : Les tubes d'isolement utilisés, d'un diamètre extérieur de 25 mm, ont une base conique pour faciliter leur introduction dans le sol. Immédiatement au-dessus de cette partie étirée sont ménagées six ouvertures très fines, réparties sur une spirale d'environ 2 cm de hauteur. Bouchés au coton, ces tubes sont stérilisés au four à flamber, puis les ouvertures de la base sont obturées avec une toile caoutchoutée stérile, genre sparadrap. Chesters utilise à cette fin un « jacket tube » dont le diamètre intérieur correspond exactement au diamètre extérieur du tube de culture. Mais cette simple bande assure une étanchéité satisfaisante et il est très aisé ensuite de nettoyer les ouvertures, l'air emprisonné s'opposant à la pénétration du milieu liquéfié à travers celles-ci. Les tubes sont alors remplis jusqu'à la moitié de leur hauteur avec le milieu nutritif ; le coton, remis en place, est protégé par une coiffe de papier cellophane et l'ensemble est introduit dans un tube de plus large diamètre, lui-même stérilisé au four à flamber et bouché au coton. On stérilise à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes. Au sortir de l'autoclave les tubes sont débarrassés de la bande de sparadrap à l'aide de pinces stériles et, toujours stérilement, les ouvertures de la base sont nettoyées et débarrassées de la petite quantité de milieu qui a pu s'y introduire. Après flambage rapide à l'alcool, les « immersion tubes » sont replacés dans les gros tubes jusqu'à usage. Il est absolument indispensable d'opérer dans des conditions d'asepsie parfaite au cours des opérations et nous avons toujours obtenu de bons résultats en opérant, chaque fois que cela est possible, entre des feuilles de papier stérilisées à l'autoclave.

Avant d'introduire les tubes d'isolement dans le terreau à étudier, on débarrasse celui-ci de la végétation superficielle et on ménage, avec un outil stérile, des trous dans lesquels on enfonce les tubes jusqu'aux 2/3 de leur hauteur ; on les laisse en place sept jours. Le moment venu, ils sont extraits du terreau et introduits aussitôt dans un tube procteteur stérile, pour les transporter au laboratoire. Là on prélève à l'emporte-pièce, bien au centre de l' « immersion tube », un cylindre d'agar qu'on dépose dans une boîte de Pétri stérile ; on le coupe en 4 segments après en avoir éliminé les extrémités ; chaque segment est reporté dans une autre boîte et divisé en 4 secteurs par deux sections longitudinales se coupant en croix, et chacun des quartiers obtenus est placé vers la périphérie de la boîte sur deux diamètres perpendiculaires. On coule au centre des boîtes le milieu nutritif gélosé maintenu au voisinage de 45°, en quantité juste suffisante pour recouvrir les fragments. Après deux jours d'incubation à la température du laboratoire les colonies peuvent être isolées.

2. Les autres techniques utilisées ne diffèrent entre elles que par le mode d'isolement. Dans tous les cas en effet les échantillons de terreau sont prélevés aseptiquement dans des tubes de 10 cm. de longueur, 9 mm de diamètre intérieur, stérilisés et bouchés au coton. Le terreau, au lieu choisi, est retiré à l'aide d'un rasoir stérile jusqu'à une profondeur de 5 cm ; le tube est rapidement enfoncé et lorsque le terreau a pénétré jusqu'à la moitié de sa hauteur, on le referme au coton et on le transporte au laboratoire. (3) Le matériel ainsi prélevé est utilisé, soit sous forme de dilutions, soit en ensemencements directs.

a) Dans un premier mode de dilution, un peu de terreau est prélevé à l'aide d'une anse de platine humide et introduit dans un tube de milieu gélosé maintenu liquide à une température aussi basse que possible. Après mélange par rotation, le contenu de ce premier tube A est coulé dans une boîte de Pétri. On verse alors dans le tube A le contenu d'un tube neuf B. On mêle et on coule dans une seconde boîte. On opère de même avec un troisième tube ; le degré de dilution croît ainsi très rapidement de A à B et de B à C. Il est moins rapide dans le second mode de dilution où 1 cc. du tube A est mêlé aux 10 cc de milieu du tube B, puis 1 cc de ce tube B est versé dans le tube C et le contenu de chacun des trois tubes est coulé dans une, boîte de Pétri.

b) Le procédé le plus rapide et, dans le cas présent, le plus efficace, consiste à ensemencer directement quelques particules de terreau dispersées à la surface du milieu refroidi en boîtes de Pétri.

Pour l'isolement nous avons eu constamment recours à un milieu à l'extrait de sol gélosé préparé d'après le procédé décrit par Lohnis en 1913 [4], modifié par l'addition d'extrait de levure. Ce milieu convient également pour l'étude des micromycètes isolés, mais il donne des croissances lentes. D'une façon plus générale nous avons eu recours aux milieux complémentaires suivants :

— 1° Milieu de Czapeck glucosé gélosé, favorable à toutes les espèces ;

— 2° Milieu à la Maltea à 0,5 ou 1 % ; convient généralement, mais les *Fusarium* s'y développent lentement ;

— 3° Milieux à la farine d'avoine gélosée, à l'amidon de riz, tranches de pomme de terre et de carotte, convenant particulièrement aux *Fusarium* et aux *Mucorinées* ;

— 4° Sabouraud d'épreuve ; fournit des développements rapides mais ne convient pas à toutes les espèces, en particulier aux *Fusarium*.

Résultats. — 1. Il faut noter en premier lieu que, probablement en raison de la nature assez spéciale du terreau, formé de débris relativement gros de Sphagnum et de frondes de Polypode, les résultats

obtenus par dilution sont très irréguliers ; il aurait été possible, dans une certaine mesure, de remédier à cet état de choses en assurant la répartition plus homogène des organismes du sol par une rotation mécanique prolongée des tubes de dilution. Pratiquement, en ce qui concerne les méthodes classiques, nous nous sommes presque toujours limités à l'isolement direct sur milieu solide à base d'extrait de sol, à partir de particules du terreau.

2. Contrairement à nos prévisions, la méthode de l' « immersion tube » s'est à première vue et avant tout essai d'interprétation, montrée plutôt décevante, au moins comme technique d'isolement. En effet, alors que les procédés classiques nous fournissent 17 espèces appartenant à des groupes de Champignons très divers, l' « immersion tube » n'a recueilli que 3 espèces dont 2, des *Fusarium*, en proportion très faible. Le tableau ci-joint résume, pour deux nombres d'isolement comparables, les résultats obtenus par l'une et l'autre méthode. (Déterminations J. Chevaugeon).

	A	B
Acrostalagmus albus Preuss	1	—
Acrostalagmus Koningi (Oud.) Duché et Heim	10	37
Bactéries : bâtonnets	6	—
cocci	3	—
Cylindrocarpon Magnusianum Woll.	1	—
Fusarium solani var. *Martii* (App. et Wr sub sp.) Wr. f. 1. Wr	5	4
Fusarium solani var. *minus* Wr.	8	2
Levure rose	1	—
Mortierella pusilla var. *isabellina* (Oud.) Zycha	2	—
Mycelium stérile	1	—
Papulaspora pannosa Hots.	2	—
Penicillium nº 1	3	—
Penicillium nº 2	2	—
Stemphylium botryosum sensu Oud.	2	—
Stemphylium macrosporoideum (Berk. et Br.) Sacc.	2	—
Sterigmatocystis nigra V. Tiegh.	6	—
Torula allii (Harz) Sacc.	2	—
	57	43

A. — Isolement par dilution ou par ensemencement direct de terreau.
B. — Isolement par la méthode de Chesters.

3. Outre la diversité beaucoup plus grande de la flore obtenue par la technique habituelle comparativement à celle révélée par le procédé de Chesters, le tableau met en évidence la prédominance évidente d'*Acrostalagmus Koningi* dans les isolements obtenus par cette dernière méthode : d'un côté nous isolons 17 espèces parmi lesquelles *Acrostalagmus Koningi* représente environ 18 % des isolements, *Fusarium solani* var. *minus* et *Sterigmatocystis nigra*

par exemple, représentant respectivement 14 % et 11 % ; de l'autre nous obtenons *Acrostalagmus* dans la proportion de 85 % ; les *Fusarium* ne représentent que moins de 5 % des cas et *Sterigmatocystis* n'est plus rencontré.

Discussion. — Des résultats aussi différents obtenus par deux procédés d'investigation d'un même sol appellent quelques commentaires :

1. Examinons d'abord le cas d'*Acrostalagmus Koningi* (*Trichoderma K.* Oud.). Ce champignon est considéré par la plupart des auteurs comme l'un des champignons du sol les plus répandus. Waksman précise qu'on le trouve plus spécialement dans les sols de forêts, les terrains mraécageux, et en général dans les sols acides ; c'est le cas de notre terreau, à réaction primitive nettement acide, imparfaitement neutralisé par les arrosages à l'eau plus ou moins chargée de calcaire. Enfin Weindling a démontré l'effet inhibitoire des *Trichoderma* sur la croissance des autres champignons du sol, et nos propres expériences confirment ce point de vue. En effet, si nous ensemençons dans une même boîte de Petri, vers les extrémités opposées d'un même diamètre, d'une part *Acrostalagmus Koningi*, d'autre part l'une des autres espèces isolées, nous observons les faits suivants :

Acrostalagmus fructifie très abondamment dans tous les cas et dans tous les secteurs du milieu de culture.

Les *Penicillium* se développent sur une aire très limitée, et seulement en colonies demeurant chétives et isolées.

Sterigmatocystis nigra forme des sporanges, mais les colonies ne s'étendent pas à plus d'un centimètre du point d'ensemencement.

Mortierella pusilla fructifie au point d'ensemencement, mais il ne développe au delà qu'un mycelium très ténu.

Cylindrocarpon Magnusianum forme très lentement un stroma brun très mince tandis qu'en culture pure ce stroma est épais et résistant.

Stemphylium macrosporoideum forme en un mois une colonie de 2 cm de diamètre ; le mycelium, très ténu, ne porte que de rares fructifications ayant l'apparence de fines ponctuations isolées et noires.

Les *Fusarium*, enfin, ne donnent naissance qu'à un mycelium laineux très limité dans son extension, sans qu'apparaissent jamais, après un mois de culture, les pionnotes pourtant très abondants sur les cultures pures du même âge.

Dans ces conditions la prédominance énorme des isolements d'*Acrostalagmus Koningi* dans la méthode de Chesters n'est pas surprenante : les « immersion tubes » qui isolent aisément le mycelium à dispersion rapide ou le mycelium localement actif recueillent

électivement *Acrostalagmus Koningi* qui de toutes les espèces est la plus active, et douée de propriétés inhibitrices certaines ; ce champignon pourrait même exercer une action protectrice vis-à-vis d'espèces présentes susceptibles de parasiter les Orchidées (*Fusarium solani* var. *minus* est signalé par WOLLENWEBER comme agent de pourriture des végétaux de cette famille).

Mais si nous nous référons à une publication récente (2), CHESTERS obtient des résultats absolument opposés, à la fois à nos propres constatations et aux idées généralement admises sur l'activité de *Trichoderma Koningi* dans le sol. Cet organisme en effet apparaît peu fréquemment dans ses isolements habituels par tubes enterrés, même quand il est représenté abondamment dans les suspensions de même sol faites en même temps que l'isolement dans les tubes. L'expérience montre cependant que, quand un mycelium actif de *Trichoderma Koningi* réalisé en culture artificielle est enfoui dans le sol, il peut être récupéré dans les tubes à immersion en l'absence de compétition d'autres espèces. Pour expliquer le fait que cette espèce fait défaut dans la plupart des isolements par la méthode d'immersion, l'auteur fait appel à diverses hypothèses : ou bien certains facteurs — non précisés — restreignent sa dispersion dans le sol ; ou bien (mais ceci est infirmé dans notre cas particulier par les expériences d'ensemencements mixtes en boîtes de Petri) il entre en compétition avec des espèces à croissance plus rapide ; ou bien encore, et nous retiendrons plus volontiers cette dernière hypothèse, une sporulation vigoureuse fait rapidement cesser la croissance végétative. Nous lisons enfin dans l'exposé du Prof. CHESTERS que *Trichoderma Koningi*, qui n'apparaît pas dans les tubes, est constamment isolé des suspensions de sol et des débris organiques qu'il contient. Ceci nous permet de lever d'une façon satisfaisante, nous semble-t-il, la contradiction apparente entre les observations de C. CHESTERS et les nôtres. Le terreau envisagé est en effet constitué presque exclusivement de débris organiques de taille assez importante que le tube à immersion rencontre nécessairement sur son parcours ; ces fragments de matières végétales serviraient de substratum au champignon dont ils stimuleraient le développement, soit par une action mécanique, soit par un apport de substances nutritives. Elargissant cette notion expérimentale et interprétant la pensée de l'auteur anglais, nous pourrions dire qu'il existe un rapport nécessaire entre certaines espèces fongiques et les débris organiques dans le sol.

2. Ceci nous amène à envisager les limites d'application de la méthode de CHESTERS. Elle s'appliquerait de préférence à un sol relativement homogène, sans enclaves organiques notables ; elle conviendrait mal, sans doute, à l'étude de la rhizosphère proche d'une plante considérée. L'auteur ne se dissimule d'ailleurs pas ces

insuffisances et pour l'étude microbiologique complète d'un terrain donné, préconise l'application simultanée des procédés suivants :

a) Prélèvement à l'emporte-pièce d'un échantillon de sol.

b) Insertion d'un tube dans la cavité ainsi formée.

c) Préparation d'une suspension homogène dans l'eau du sol prélevé.

d) Séparation des débris organiques contenus dans cet échantillon.

Ces deux dernières opérations sont réalisées dans des conditions d'asepsie parfaite grâce à un appareillage minutieux conçu par l'auteur mais qui, malheureusement, n'est pas à la portée de tous les laboratoires.

La confrontation des isolements obtenus à partir du tube enterré, des suspensions et des débris organiques, fournit alors une image complète de la population fongique du sol examiné et permet d'envisager plus sûrement les problèmes complexes de leurs activités biologiques et de leurs caractères sociologiques.

La technique de Chesters n'exclut donc pas les méthodes classiques, mais les complète heureusement ; elle donne une impulsion nouvelle et fournit un instrument de travail précieux aux recherches d'un intérêt si actuel sur la microbiologie des sols.

Laboratoire de Cryptogamie du Muséum.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Chesters (C. G. C.). A method of isolating soil fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, XXIV, pp. 352-355, ffg. ,1940.

(2) Chesters (C. G. C.). A contribution to the study of fungi in the soil. *T. B. M. S.* 30 (1948), 100-17, 5 fig. (Proc. of the Jub. meet. London, 1946).

(3) Duché (J.) et Heim (Roger). Recherche sur la flore mycologique des sols sableux. I. Micromycètes des dunes littorales de Biville-Vauville (Cotentin), *Travaux cryptogamiques dédiés à Louis Mangin*, Paris, 1931.

(4) Lohnis. Laboratory method in agricultural bacteriology, p. 161, Trans. W. Stevenson et J. M. Smith. Griffith and C°, 1913.

(5) Waksman (S. A.). Soil Fungi and their activities. *Soil Sci.* 2, 103-156, 1916.

(6) Winogradsky (M. S.). Sur la méthode directe de l'étude microbiologique du sol. *C. R. Acad. Sc.* 177, 19 nov. 1923.

(7) Winogradsky (M. S.). Etudes sur la microbiologie du sol. *Ann. Inst. Past.*, 39, p. 299-554, avril. 1925.